

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Efeito da gonadectomia nos níveis  
hormonais e no comportamento de  
machos de *Oreochromis mossambicus*  
(Peters, 1852)

Aricson Elísio Cruz Pires Delgado

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha  
Faro 2010

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Efeito da gonadectomia nos níveis  
hormonais e no comportamento de  
machos de *Oreochromis mossambicus*  
(Peters, 1852)

Aricson Elísio Cruz Pires Delgado

Orientadores: Professor Doutor Adelino Canário  
Doutor Peter Hubbard

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha  
Faro 2010

O presente trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor,

---

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Adelino Canário por tão prontamente concordar em orientar-me, permitindo-me assim ter acesso aos seus vastos conhecimentos de Biologia Molecular, nomeadamente os de Endocrinologia Molecular.

Ao meu co-orientador Doutor Peter Hubbard por toda a paciência, disponibilidade, atenção e ajuda.

À Elsa Couto por todo o apoio, dedicação, preocupação e paciência, que de certeza tornaram a minha estadia no laboratório muito mais amena.

Ao Marco Campinho pelas valiosas discussões, trocas de ideias e perspectivas e por estar sempre disponível. À Lawrance Dellofre por estar sempre lá quando eu precisasse. A todos os outros colegas do grupo Comparative and Molecular Endocrinology por me terem bem recebido e ajudado sempre que necessário.

A todos os meus colegas de curso, companheiros dessa árdua jornada, pela inter-ajuda, respeito, carinho e boa convivência durante o período lectivo.

Aos meus amigos Carla, Jackson, Carlos, Dona Joana, Wilson, Mosab, Samir, Fernando, Evandro, Jandir, Dona Alice e Ritinha; e familiares cá em Portugal: meu primo Luís e família, Tia Alice, Tia Neusa, Mila e Zé.

Um agradecimento muitíssimo especial aos meus pais adorados, à Gilda, meus irmãos, parentes e amigos pelo afeto, amor, compreensão, e auxílio ao longo de todos esses anos de estudo. Um muito obrigado pelo encorajamento que sempre me dão.

## **Resumo**

Nos vertebrados, incluindo os peixes as hormonas activam e modificam o comportamento, e o comportamento por sua vez altera os níveis de hormonas, em particular os androgénios. A principal fonte de hormonas esteróides são as gónadas, mas o cérebro e outros tecidos também as produzem. A castração produz efeitos variados nos níveis hormonais e no comportamento sexual e agonístico dos teleosteos.

Os objectivos deste estudo são: verificar a possível razão porque os níveis de androgénios continuam elevados após a gonadectomia, incluindo a possibilidade de contribuição de secreção de esteróides por tecidos extra-gonadais; e ainda de que forma a gonadectomia afecta o comportamento dos animais. Para isso foram efectuadas cirurgias a mais de 20 indivíduos de tilapia moçambicana e foram também retiradas amostras de sangue. Ainda foram retirados e incubados diversos tecidos - como cérebro, rim anterior e posterior, brânquias, fígado e sangue - para a identificação de fontes extragonadais de esteróides. A medição dos níveis hormonais de testosterona, 11-cetotestosterona e 17,20 $\beta$ -progesterona foi realizada através da técnica do radioimunoensaio. Os resultados obtidos mostram que a castração teve um efeito de diminuição muito ténue nos níveis hormonais, sendo que o comportamento dos animais manteve-se praticamente inalterado. O tecido que demonstrou maior capacidade de metabolização do precursor 17-HP foi o rim. Esses resultados podem ser explicados por regeneração do tecido das gónadas, e hipertrofia com consequente feedback positivo, ou ainda pela produção extragonadal de androgénios.

**Palavras-chave:** tilapia; *Oreochromis mossambicus*; androgénios; gonadectomia; comportamento; castração.

## **Abstract**

In vertebrates, including fish the hormones activate and modify behavior, and behavior in it turn alters the hormones levels, specifically the androgens. The main source of steroid hormones are the gonads, but the brain and other tissues are able to produce too. The castration produces varied effects in the hormonal levels and agonistic and sexual behavior of teleost fish. The objectives of this work are: to verify the possible reason because the androgens levels still high after the gonadectomy, including the possibility extragonadal steroid secretion; and the way that gonadectomy affects the animal behavior. For that it was made surgeries in more than 20 individuals of *Oreochromis mossambicus*, and blood was sampled. Different tissues was extracted and incubated - as brain, kidney, gills, liver and blood - for the identification of extragonadal sources of steroids. The measurement of testo, 11-Kt, and 17, 20-BP levels were accomplished through the RIA technique. The results show that the castration small decrease effect in the hormonal levels and the behavior of the animals were practically unaffected. The tissue that shows larger capacity to metabolize the precursor 17-HP was the kidney. This result can be explained by gonadal tissue regeneration, and hypertrophy with consequent positive feedback, or by the production of extragonadal androgens.

**Key words:** tilapia; *Oreochromis mossambicus*; androgens; gonadectomy; behavior; castration.

## Índice

Resumo.....	5
Abstract .....	6
1- Introdução.....	9
2- Materiais e Métodos .....	14
3- Resultados.....	18
4- Discussão.....	30
5- Conclusões e Recomendações.....	32





## 1- Introdução

Nos vertebrados, incluindo os peixes as hormonas activam e modificam o comportamento, e o comportamento por sua vez altera os níveis de hormonas, em particular os androgénios. As hormonas podem afectar o comportamento actuando em estruturas somáticas com função epigâmica. Os caracteres sexuais secundários desempenham um importante papel na comunicação intraespecífica, permitindo o reconhecimento sexual e potencialmente fornecendo informação acerca do estatuto social ou sexual do indivíduo. Nos teleósteos tais caracteres secundários têm demonstrado serem androgeno-dependentes (Oliveira e Canário, 2009). Contudo as evidências têm também demonstrado que os androgénios não são apenas um factor causal dos comportamentos reprodutivos mas podem ser também afectados pelas interações entre conspécíficos sugerindo uma relação bidireccional entre androgénios e comportamento. Peixes teleósteos como os salmões machos, por exemplo, têm um aumento nos níveis de esteróides sexuais e de gonadotropinas e um incremento na produção de esperma na presença de fêmeas ovuladas (Liley et al., 1993).

A principal fonte de hormonas esteróides são as gónadas, mas o cérebro e outros tecidos também as produzem. No cérebro, os androgénios estão associados ao comportamento sexual e agonístico.

Como resultado de experiências de castração para investigar o papel das hormonas há relatos de níveis elevados de esteróides ao fim de vários dias ou mesmo semanas. Em ratos adultos os níveis da hormona luteinizante (LH) no soro elevaram-se mais rapidamente em machos após a orquidectomia (dentro de 24 h) que em fêmeas após a ovariectomia (entre 3-5 dias), enquanto que os níveis da hormona folículo-estimulante (FSH) aumentaram numa taxa acelerada (9h) em ambos os sexos (Hiatt et al., 1987). Lehari (1966) observou que a glândula pituitária de peixes gonadectomizados sofre mudanças consideráveis na actividade dos cianófilos da meso-adenohipófise enquanto outras partes da glândula não são afectados pela remoção das gónadas. A castração de adultos de salmão coho - *Oncorhynchus kisutch* - em fase de espermiacção, elevou os níveis de plasma de ambos FSH e LH, demonstrando a presença de retroacção gonadal negativa nesta fase (Borg et al., 1998). Na *Tilapia aurea* a ovariectomia resultou em hipertrofia compensatória do tecido remanescente. A hipertrofia compensatória manifestou-se pelo aumento do número de ovogónias e pela hipertrofia e hiperplasia da membrana plasmática dos ovócitos indicando um estímulo fisiológico (Dadzie & Hyder, 1976).

Mayer et al. (1998) investigou os efeitos da gonadectomia nos níveis de somatolactina (SL) no plasma e na pituitária do salmão do Atlântico (*Salmo salar*). Sendo que os peixes castrados tiveram níveis plasmáticos e no conteúdo na pituitária mais reduzidos de SL que espécimes sham. Nesse estudo à semelhança de um prévio do mesmo autor (Mayer et al., 1990) os níveis de esteróides nos peixes castrados foram indetectáveis.

A área pré-óptica, um dos constituintes do núcleo hipotalâmico hipotalâmico, está relacionada com a função endócrina, e com o comportamento reprodutor (DeGroot, 1989b). A castração aumentou o nível de GnRH mRNA e aumentou o número e o tamanho das células GnRH na área pré-óptica (Francis et al., 1992b; Soma et al., 1996; Parhar et al., 1998; Soga et al., 1998; Amano et al., 1999).

A gonadectomia tem demonstrado ser capaz de reduzir ambos os comportamentos agonísticos e sexuais, enquanto que a administração de androgéneos restaura esses comportamentos em indivíduos castrados e têm um efeito estimulante em machos

intactos (Aronson, Scharf, & Silverman, 1960; Wapler-Leong & Reinboth, 1974; Fernald, 1976; Francis et al. 1992a). Não é totalmente correcto equacionar ou correlacionar androgénios com orientação sexual masculina e com agressão. A agressão não é um dado bruto de estudo, é um conceito que é inferido apartir dos dados brutos de combates e ataques relacionados com o espaço territorial, sexo, espécie, intrusos ou inimigos. Alguns estudos de hormonas e agressão em animais têm sido suficientemente sofisticados para especificarem todas as variáveis relevantes, mas a maioria não tem (DeGroot, 1989c).

Os objectivos deste estudo são: verificar a possível razão porque é que nalguns estudos os níveis de androgénios continuam elevados após a gonadectomia, incluindo a possibilidade de contribuição de secreção de esteróides por tecidos extra-gonadais; e ainda de que forma a gonadectomia afecta o comportamento dos animais.

### **1.1- Hormonas: origem e função**

A evolução de seres unicelulares para organismos multicelulares demandou a existência de comunicação e coordenação entre várias componentes dos organismos multicelulares, e para este propósito evoluíram dois sistemas: o sistema nervoso, e o sistema hormonal ou endócrino. O sistema endócrino tem a função de produzir substâncias químicas designadas hormonas - do grego: hormona = “activar” (DeGroot, 1989a). Estas substâncias são segregadas a baixas concentrações na corrente sanguínea ou em outros fluídos corporais. A sua função é exercer uma acção reguladora (indutora ou inibidora) noutros órgãos ou regiões do corpo. Em geral actuam devagar e agem por muito tempo, regulando o crescimento, o desenvolvimento, a reprodução e as funções de muitos tecidos, bem como os processos metabólicos do organismo. As características comuns às hormonas são: circulam em baixa concentração, acoplam-se a receptores específicos, não são segregadas a uma velocidade constante e não criam reacções enzimáticas novas.

As hormonas nos vertebrados pertencem a duas categorias principais de compostos químicos. Algumas são produzidas a partir do colesterol (*vide anexo 1*), como é o caso das hormonas esteróides provenientes do córtex adrenal e das gónadas; e outros são compostos de aminoácidos e variam em complexidade em relação aos primeiros, como por exemplo a epinefrina que deriva de uma simples molécula de tirosina, até outros como a hormona de crescimento pituitária que contem cerca de 190 aminoácidos (Bentley, 1982).

### **2- Hormonas esteróides**

Hormonas esteróides são reguladoras primárias em muitos sistemas. Os esteróides sexuais, estrogénios, androgénios e progestagénios, são controlados por hormonas hipotalâmico – pituitárias, são os reguladores hormonais primários da reprodução e funções acessórias incluindo comportamento sexual (DeGroot, 1989c; Norris, 1987). Os androgénios são essenciais na espermatogénese, no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e na expressão de comportamentos reprodutivos. Muitos estudos em diferentes vertebrados têm demonstrado o papel activacional (ou permissivo) dos androgénios na expressão dos comportamentos sociais dos machos, tanto sexual como agressivo (Oliveira et al., 2002).

### **3- Gónadas e esteróides: o eixo HPG e as gonadotropinas**

Ambas as gónadas masculinas e femininas cumprem duas funções: gametogénese e esteróidogénese. As gónadas masculinas ou testículos são os órgãos

primários de reprodução nos machos. Ambas as funções esteróidogénica e gametogénica nas gónadas masculinas são reguladas pelas gonadotropinas. Os esteróides sexuais masculinos têm actividade tanto androgénica como anabólica. A actividade androgénica estimula o crescimento e o funcionamento de órgãos reprodutores acessórios e o desenvolvimento de caracteres sexuais especiais, que constituem a base dos bioensaios dessas hormonas. A actividade anabólica estimula o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (McDonald, 1989).

O testículo dos teleósteos difere da maioria dos vertebrados pela sua capacidade em sintetizar derivados de androstenediona e testosterona com pelo menos um grupo hidróxilo ou um grupo keto na posição 11 do núcleo esteroide. Acredita-se que estes androgénios são responsáveis pelos caracteres sexuais secundários nos machos (por exemplo o espessamento da pele e as mudanças de cor) e pelo estímulo da espermatogénese e espermição nos teleósteos. Vários estudos estão de acordo que a testosterona produz hipertrofia muscular por aumentar a síntese de proteínas musculares (Bhasin et al., 2001). A 11-ketotestosterona (*vide anexo 2*) é o maior androgénio nos teleósteos, embora o 11 $\beta$ -hidróxitestosterona predomine em teleósteos ambissexuais (Chester-Jones et al., 1987; Rocha & Reis-Henriques, 1996). A 17,20 $\beta$ -dihidróxi-4-pregnen-3-ona (17,20 $\beta$ -P) desempenha um importante papel na maturação final nos gâmetas de ambos os sexos de peixes salmonídeos (Kime, 1993).

Nos vertebrados, os níveis circulatórios de androgénios são regulados pelo eixo hipotalâmico – pituitário - gonadal (HPG), através do qual o cérebro controla as gónadas - via glândula pituitária (Parikh et al., 2006). Por outro lado, a regulação do eixo HPG (*vide anexo 3*) envolve uma complexa interacção entre péptidos e hormonas esteróides. O mecanismo regulatório de retroacção por hormonas sexuais é complexo e inclui efeitos ao nível hipotalâmico e pituitário (Levavi-Sivan et al., 2006).

### **3.1-Esteroidogénese em tecidos periféricos**

O cérebro, a medula e o sistema nervoso periférico são capazes de sintetizar esteróides a partir do colesterol e de metabolizar os esteróides hormonais em derivados activos que podem ser potentes neuromoduladores. Entre os esteróides sintetizados localmente no sistema nervoso central se encontram a pregnenolona, a dihidroepiandrostenediona (DHEA) e a testosterona.

As hormonas sexuais actuam no sistema nervoso como reguladores neuroendócrinos e da conduta sexual e também como factores tróficos que participam na manutenção geral da actividade neural. Estas hormonas influenciam o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central, exercendo efeitos muito variados sobre neurónios, sinapses, glia e regulando a sobrevivência, diferenciação e conectividade de grupos neuronais específicos. As hormonas sexuais ainda têm efeitos neuroprotectores, sendo que estímulos neurodegenerativos aumentam a síntese de esteróides no cérebro.

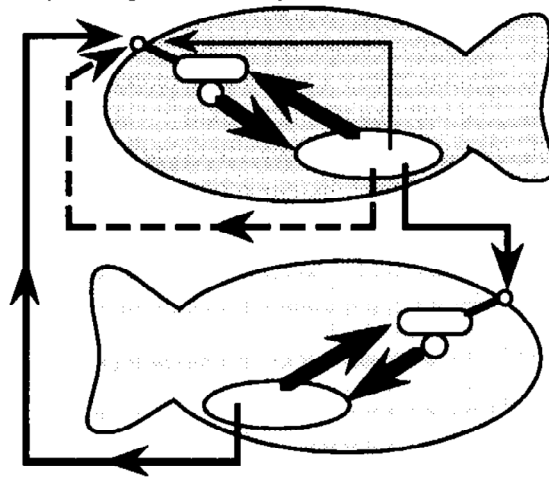
O mecanismo clássico de acção das hormonas sexuais no sistema nervoso central é feito através da interacção com seus receptores intracelulares: os receptores de estrogénio alfa e beta, o receptor de androgénios e o receptor de progesterona. Estes receptores estão amplamente distribuídos por todas as regiões do sistema nervoso central. Para além da regulação da transcrição através de receptores nucleares, as hormonas sexuais exercem efeitos rápidos sobre a sinalização intracelular de neurónios e glia, modulando os níveis de cálcio intracelular e AMPc, activando proteínas G e regulando a fosforilação de cinases. Também regulam a actividade neural modulando a actividade dos canais iónicos associados aos receptores de GABA<sub>A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, NMDA, AMPA, ácido caínico, glicina e dos nicotínicos de acetilcolina (García-Segura, 2008).

#### **4 - Hormonas e metabólitos: a função de feromonas**

Em muitas espécies de peixes, hormonas gónadais (ex: esteróides e prostaglandinas) e seus metabólitos, actuam não só como sinais químicos internos, mas também são libertados - através da urina, brânquias, pele ou fezes - para actuarem como sinais químicos externos (feromonas hormonais) com acção na fisiologia e comportamentos reprodutivos e não reprodutivos (migração, interacções progenitores-juvenis, agregação e comportamentos sociais relacionados) dos conspecíficos. Tais feromonas reflectem o estado reprodutivo do emissor acabando por afectar a fisiologia e comportamento reprodutivo dos recetores (Stacey & Cardwell, 1994; Barata et al., 2007).

Primeiramente, as feromonas hormonais ilustram a velocidade com que cada mudança no estado hormonal de um indivíduo pode ser assinalada aos seus conspecíficos. Com as feromonas hormonais, a demora entre a síntese da hormona e liberação da feromona correspondente é tão célere que pode ser monitorizada pelos conspecíficos (Stacey & Cardwell, 1994).

As feromonas hormonais podem fazer-nos reconsiderar o que definimos como sistema hormonal regulador da reprodução. Tradicionalmente a unidade de função reprodutiva de uma espécie tem sido o eixo HPG de um indivíduo, capaz de gerar internamente uma função tónica e cíclica, mas também responder a estímulos exógenos. Mas porque hormonas conspecíficas libertadas podem ser estímulos exógenos efectivos, a unidade de função reprodutiva precisa ser expandida para incluir as acções de retroacção feromonais das hormonas libertadas pelos indivíduos, tanto em forma de auto-estímulo, como também indirectamente pelas feromonas hormonais estimulantes libertados pelos conspecíficos (ver fig. 1).



**Figura 1 – O controlo hormonal da reprodução nos peixes pode envolver tanto mecanismos endógenos como mecanismos exógenos (extraído de Stacey & Cardwell, 1994)**

Na espécie *Carassius auratus*, que tem um dos sistemas de feromonas sexuais mais bem compreendidos entre os teleósteos, as feromonas hormonais das fêmeas funcionam primariamente como sinal para sincronizar a libertação de gâmetas masculinos e

femininos. No peixe zebra (*Danio rerio*), as feromonas masculinas estimulam a reprodução nas fêmeas e aumentam a qualidade e viabilidade dos ovos. Na tilápia (*Oreochromis mossambicus*) foram observadas concentrações elevadas de hormonas esteróides conjugadas e esteróides altamente polares tendo sido sugerido que provavelmente actuam como feromonas (Rocha & Reis-Henriques, 1996). Na tilápia a urina é usada como um veículo para as feromonas masculinas, as quais podem ajudar na determinação de uma dominância social (Barata et al., 2007).

A descoberta de grandes quantidades de esteróides conjugados (sulfatos e glucuronídeos) na urina da *O. mykiss* sugere que esta pode servir como veículo de hormonas conjugadas, mais concentradas que no plasma (Vermeirssen & Scott, 1996). Mais tarde Vermeirssen e seus colaboradores (1997) confirmaram mesmo a existência de uma feromona na urina da fêmea de *O. mykiss*, capaz de causar rápidos aumentos nos níveis plasmáticos de 17,20- $\beta$ -P e nas quantidades de esperma dos machos.

Os machos anósmicos na presença de fêmeas sexualmente activas têm níveis reduzidos de esteróides sexuais e uma produção de esperma mais baixa que machos com o epitélio olfactivo intacto, o que sugere que sinais químicos têm uma função importante na modulação social de níveis hormonais. Em cíclídeos (ex: *Oreochromis mossambicus*) os machos são sensíveis ao estado de maturação das fêmeas, cortejando mais intensamente fêmeas ovuladas. Este efeito também parece ser mediado por sinais químicos emitidos por fêmeas receptivas (Oliveira et al., 2002). Os machos cíclídeos também experimentam um aumento na 11-cetotestosterona em resposta a interações de coorte (Borges et al., 1998).

### **5-Factores bióticos e abióticos: sua influência sobre o comportamento e fisiologia reprodutiva**

O comportamento e a fisiologia reprodutiva podem ser regulados por factores ambientais incluindo o clima, temperatura e o comprimento do dia; assim como por circunstâncias sociais, idade; e outras variáveis relacionadas com a oportunidade e capacidade reprodutiva. Esses factores de regulação influenciam muitas variáveis fisiológicas incluindo níveis hormonais e mudanças no cérebro (Parikh et al., 2006).

**Objectivo Geral:** Verificar possível razão pq é que nalguns estudos níveis androgénios continuam elevados após gonadectomia;

#### **Objectivos Específicos:**

- Incluindo possibilidade de secreção de esteroides por tecidos extra-gonadais.
- Inferir efeitos da castração sobre o comportamento de espécimes de *Oreochromis mossambicus*.

## **2- Materiais e Métodos**

### **1- Aquisição e manutenção dos indivíduos**

Neste trabalho foram usados cerca de 30 espécimes machos e maduros de *Oreochromis mossambicus*, que foram retirados de estoques mantidos no LEOA do Campus de Gambelas e na estação do Ramalhete, infra-estruturas pertencentes à Universidade do Algarve. Os peixes fundadores desta população foram obtidos no Rio Incomati, Moçambique, no início da década de 70. Os indivíduos foram mantidos em tanques de fibra com a parte frontal em vidro (100 cm x 50 cm x 60 cm; comprimento x largura x altura, 300 l), à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , e foram alimentados diariamente com alimento comercial para cíclídeos (Nutrafin basix<sup>®</sup>; Rolf C. Hagen, Inc., Montreal, Canada). Cada tanque possuía uma camada de substrato arenoso ( $\approx 9$  cm), biobolas, termóstato, um sistema de filtragem simples, e arejamento permanente (*vide anexo 4*). Todos os indivíduos foram identificados através de placas de marcação com 3 dígitos, ou então pela combinação de missangas de diferentes cores colocadas junto à barbatana dorsal. Sendo que durante o processo de marcação tomava-se também o peso e comprimento do animal. Os indivíduos usados nas experiências tinham comprimentos que variavam entre os 8 e os 14 cm, com uma média de  $11,58 \pm 1,82$  cm; e pesavam entre 32 a 65 g, com uma média de  $50,42 \pm 9,34$  g.

### **2- Recolha de plasma sanguíneo**

Foram recolhidas amostras de plasma 1 dia antes da cirurgia e 2 semanas após a cirurgia. Para tal usaram-se seringas heparinizadas para retirar 100  $\mu\text{l}$  de sangue da aorta caudal dos espécimes previamente anestesiados com MS222<sup>®</sup> (éster etílico de ácido 3-aminobenzóico) à 0,15 g/l (*vide anexo 5*). De seguida as amostras de sangue eram centrifugadas (5 min/ 600 rpm) para separar o plasma das células, o qual foi preservado a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **3- Cirurgia: gonadectomias e sham**

Para a execução do procedimento cirúrgico os peixes foram anestesiados por imersão em água contendo MS222<sup>®</sup> ( $\approx 0,15$  g/l), durante cerca de 10 minutos. Durante o procedimento cirúrgico a respiração do animal, as brânquias eram irrigadas por um tubo de silicone, introduzido na boca do peixe com água arejada contendo MS222<sup>®</sup>. A cirurgia durava cerca de 15 a 25 minutos e consistia numa incisão em forma de Y invertido na cavidade abdominal dos animais. O corte começava na zona entre as barbatanas peitorais e depois a bifurcação era feita de forma a não afectar nem o orifício genital e nem a bexiga (*vide anexo 6*). Após o corte procedia-se a localização das gónadas, estas têm uma cor entre o branco-creme e o amarelo, e possuem uma forma ovalada. Ao encontrar-se tais órgãos estes eram removidos recorrendo-se ao uso de uma pinça para segurar numa extremidade e puxa-los para fora. Posteriormente colocava-se um pouco de antibiótico e então com agulha e linha cirúrgica procedia-se a sutura do

corte, com dois pontos em cada linha do Y. Após a sutura passava-se um pouco de betadine para evitar futuras infecções, e de seguida um pouco de cola para assegurar que a sutura não fosse rompida.

Em relação aos espécimes *sham* o método aplicado foi semelhante, à excepção que as gónadas não eram removidas.

Após a cirurgia os machos passavam 48 h num tanque de recuperação antes de serem devolvidos ao tanque original. No final da experiência os animais foram sacrificados com uma overdose de MS222<sup>®</sup> (0,5g/l) para verificar se as gónadas tinham sido extraídas na totalidade. Para tal decapitaram-se os indivíduos para recolha dos tecidos cerebrais; recolhendo-se também os rins e gónadas que foram preservados em líquido de Bouin para análise histológica. Antes da recolha das gónadas e dos rins verificava-se o tamanho, estado, cor, e ligação as vísceras e/ou ao poro genital e por fim pesavam-se estes tecidos.

#### **4- Esteróidogénese nos tecidos periféricos**

**4.1 Incubação** – Os peixes foram sacrificados com uma overdose de MS222<sup>®</sup> (0,5g/l) e foram recolhidos os seguintes tecidos para uma caixa de Petri com solução de Ringer: sangue, brânquias, fígado, rim anterior e posterior, região préóptica e bulbo olfativo. De cada um foram colocados cerca de 10 mg em cada poço de uma placa de cultura com 12 poços e adicionou-se a cada 1 µl (1µCi) de 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona, 1 ml de solução de Ringer e colocou-se a tampa da placa para evitar perdas de humidade. De seguida incubaram-se os tecidos durante 6 horas num vortex de placas (IKA<sup>®</sup> Vibrax VXR basic), à temperatura de 23 °C com agitação muito lenta. Posteriormente adicionou-se a cada poço 10 µl de 17-P e 10 µl de 11 KT. Seguidamente, com uma pipeta, retirou-se 1 ml dos conteúdos de cada poço e colocou-se num tubo de ensaio de vidro com tampa.

**4.2 Extracção de Esteróides Livres** – A cada um dos tubos foi adicionado 4 ml de éter dietílico, os quais foram levados ao vórtex por 7 minutos, e posteriormente à centrífuga a 600 rpm por 5 minutos. Cada tubo foi colocado em azoto líquido de forma a congelar a parte debaixo aquosa da mistura heterogénea e assim poder-se retirar o sobrenadante por decantação (*vide anexo 7*). Este último foi evaporado a 40°C. O processo de extracção foi repetido duas vezes para maximizar a eficiência do mesmo. A fase aquosa foi utilizada para extracção de esteróides conjugados (sulfatos e glucuronídeos).

**4.3 Libertação de Sulfatos** – Evaporou-se a fase aquosa com azoto gasoso em banho-maria a 40°C. Fez-se uma solução de ácido trifluoroacético (que hidrolisa as ligações entre os esteróides e os grupos sulfato) em acetato de etilo (1:100), e adicionou-se 1 ml a cada tubo. Depois deixou-se em banho-maria a 40°C com agitação de um dia para o outro. No dia seguinte evaporou-se a solução de TFA em azoto gasoso e adicionou-se 500 µl de tampão acetato (Stock A – 8,2 g de acetato de sódio/100 ml de água destilada; Stock B- 8,5 ml de HCL/100 ml de água destilada; retirou-se 10 ml do stock A+ 2,8 ml do stock B).

A cada um dos tubos foi adicionado 4 ml de éter dietílico tendo-se procedido à extracção de esteróides como indicado para os esteróides livres em 4.2.

**4.4 Libertação de Glucorónidos** – Após a extração de sulfatos evaporaram-se os restos de éter dietílico da fase aquosa e adicionaram-se 10 µl de suco gástrico de caracol *Helix pomatia* (Sigma) que contém a enzima  $\beta$ -glucoronidase. Incubou-se de um dia para o outro a 37 °C com agitação. Posteriormente fez-se a extracção dos esteróides libertados como indicado para os esteróides livres em 4.2.

#### **4.5 Cromatografia de Camada Fina (TLC)**

A placa de cromatografia consiste em numa placa de vidro sobre o qual existe uma camada de material adsorvente - gel de sílica. Os extractos de esteróides da incubação de tecidos (produtos de incubações com precursor radioativo) foram re-suspensos em 50 µl de diclorometano e aplicados na zona de pré-adsorção de cada faixa na placa (Partisil LK6DF) –através de uma seringa. Uma segunda aplicação em 40 µl de diclorometano foi feita após secagem da zona pré-adsorvente.

As paredes do interior do tanque de cromatografia foram revestidas por papel de filtro para ajudar a saturar homogeneamente o tanque com o solvente da fase móvel. A fase móvel consistiu de uma mistura de clorofórmio/metanol na proporção 48:2. Após cerca de cerca de 40 minutos para atingir o equilíbrio no interior do tanque e secagem da zona pré-adsorvente introduzia-se a placa no tanque de cromatografia por aproximadamente 50 minutos. Por fim levava-se a placa para o Bioscanner (*Auto-changer 3000 - System 200 Imaging Scanner*), para detectar as emissões de partículas beta que ionizam uma mistura de argon/metano sendo o registo feito por computador.

Com base na posição da radioatividade nos cromatogramas as frações correspondentes aos picos foram eluídas da placa. Cada faixa de TLC foi raspada e introduzida numa ponta de plástico contendo algodão para reter a sílica que por sua vez estava introduzida num tubo de ensaio com o nome respectivo.

##### **4.5.1- Acetilação e oxidação com trióxido de crómio**

Para tentar obter alguma informação sobre a estrutura dos metabolitos foram realizadas acetilações e/ou oxidações com trióxido de crómio. O processo de acetilação consiste na adição por desidratação de um grupo acetato (OAc) ao grupo álcool (OH) do esteróide; a oxidação com trióxido de crómio consiste em converter os grupos álcool (OH) e oxidação da cadeia lateral em cetonas (=O).

Como estávamos interessados em demonstrar a produção de androgénios em tecidos periféricos seleccionámos as fracções que comigravam com 11-KT e os que comigravam com T para análise microquímica. Os primeiros através de oxidação com trióxido de crómio esperava-se que originasse 4-androstene-3,11,17-trione e os segundos através de acetilação originariam testosterona-17 $\beta$ -acetato, ambos de conspícuos na TLC.

Para a oxidação por trióxido de crómio adicionou-se a cada tubo de ensaio contendo os eluatos dos picos radioactivos (A na Figura 8) 120 µl de trióxido crómico e 200 µl de ácido acético glacial. Os tubos foram tapados e bem envolvidos em papel de alumínio



(pois essa reação é fotossensível) e deixou-se a reagir durante a noite. Para terminar a reação foram 1 ml de metabissulfito de sódio a 1 %. Adicionou-se 4 ml de éter dietílico, agitados no vortex de placas (*IKA® Vibrax VXR Basic*), extraídos com éter dietílico como indicado acima e aplicados na placa TLC, a que se seguiu leitura no bioscanner.

Para a acetilação (B na Figura) adicionou-se 100 µl de piridina e 200 µl de anidro acético a cada tubo de ensaio contendo os eluatos dos picos radioactivos (B na Figura 8), deixando-se a reagir durante a noite num agitador (Heidolph Unimax 2010). A reação terminou pela adição de 1 ml de HCl [1M]. Após extração e TLC foi feita a leitura no bioscanner.

#### **4.5.2. – TLC de plasma sanguíneo**

Com o objectivo de validar se os radioimunoensaios (RIA) estavam de facto a medir os esteróides específicos objecto do estudo foi feita uma compilação de plasmas de diferentes indivíduos (*pools*), os quais foram extraídos e as fracções (0,5 cm) livres, sulfatos e glucuronídeos separadas em TLC de acordo com a metodologia acima descrita e as fracções obtidas foram analisadas pelos RIAs correspondentes. As amostras de plasma foram as obtidas neste estudo (referenciados como Aricson) e as experiência obtidas por Vieira (2009) referenciadas como Filipa (Tabela 2).

**Tabela 2 - Amostras de plasmas na preparação para RIAs**

<b>Procedência do plasma</b>	<b>Nº tubo</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Categoria do pool de plasma</b>	<b>Volume usado</b>
Filipa	1	0	Sham	460 µl
	2	10	Sham	950 µl
	3	0	Operado	500 µl
	4	10	Operado	1100 µl
Aricson	5	0	Sham	150 µl
	6	15	Sham	75 µl
	7	0	Operado	150 µl
	8	15	Operado	125 µl

#### **5- Análise por radioimunoensaios de fracções plasmáticas**

O radioimunoensaio é uma técnica muito sensível e específica, usada para medir directamente a concentração de um ou mais antigénios (no nosso caso hormonas no plasma sanguíneo) sem a necessidade de usar um bioensaio.

Para executar um radioimunoensaio, uma quantidade conhecida de um antigénio radioativo

Antigénio é misturado com uma quantidade conhecida de anticorpo específico para este mesmo antigénio. Uma amostra contendo uma quantidade do mesmo antigénio não

radioactivo é adicionado que irá competir antígeno para os locais de ligação do anticorpo com o antígeno radioactivo.

Quando se aumenta a concentração do antígeno não radioactivo, mais deste se liga ao anticorpo e menos do radioactivo.

Os antígenos ligados são então separados dos não ligados, e a radioactividade dos antígenos de uma das fracções (ligados ou não ligados) medida. É assim possível fazer uma curva padrão, estabelecendo a quantidade de marcador ligado medido (ou livre) em função da quantidade de antígeno não marcado adicionado.

Finalmente é possível comparar a quantidade de antígeno radioactivo (ligado ou não ligado) em amostras de concentração desconhecida de antígeno não radioactivo através da curva padrão e estabelecer a quantidade na amostra.

## **6- Comportamento**

Para a experiência de monitorização de comportamento foram usados 2 tanques. Em cada tanque foram colocados 10 machos e 5 fêmeas (para modular o comportamento agressivo nos machos e ainda monitorizar os comportamentos de coorte). O comportamento de cada macho foi observado durante 3 minutos de manhã (09:00-10:00) e de tarde (17:00-18:00) todos os dias (120 min = 2h/dia), durante uma semana (10h /semana). Foi efectuada uma semana de observação antes das gonadectomias e mais uma semana após voltar o comportamento normal, afectado pelo stress cirúrgico. Foi efectuada feito uso de videogravação para registro de imagens dos espécimes nesta fase. Nesta semana de observação pós - cirúrgica completaram-se 1200 minutos (20 h) de observação de comportamento. Os comportamentos sociais agonísticos monitorizados são os descritos por Oliveira e Almada (1990).

## **7- Análise de Dados**

Foram obtidas estatísticas básicas (média e erro padrão da média) a todos os dados mensuráveis. Foram ainda aplicadas análise de variância (ANOVA) de factor único e para testar o efeito da cirurgia nos níveis hormonais e comportamento e análise de correlação para determinar relações entre as múltiplas variáveis utilizadas. Os programas informáticos utilizados foram o Microsoft Excel, Sigmaplot (versão 3.5, Systat Software Inc.) e Sigmaplot (versão 10.0, Systat Software Inc.).

# **3- Resultados**

## **1- Comportamento e Biometria**

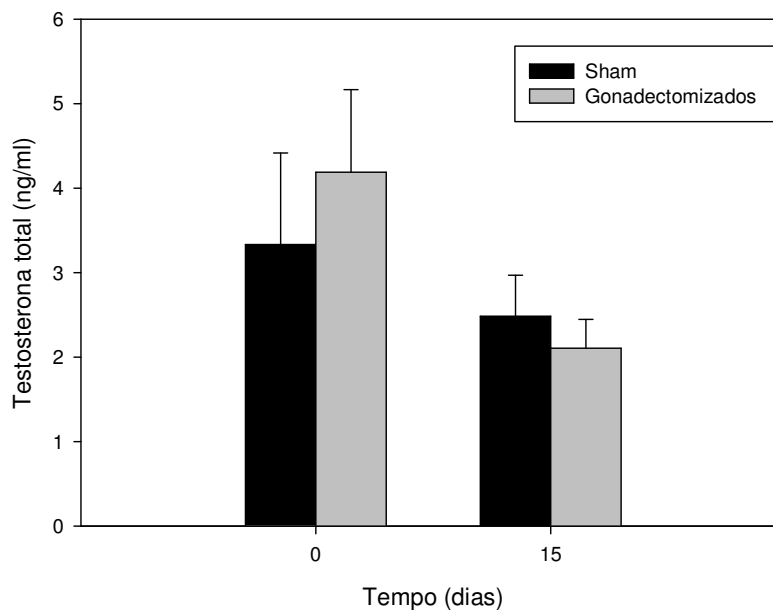
Foi encontrado um indivíduo com dois testículos não conectados à cavidade abdominal e hipertrofiados, três indivíduos com um único testículo hipertrofiado, e três indivíduos com metade de um testículo sendo que dois não estavam conectados à cavidade abdominal. O peso das gónadas encontradas variou entre 0,10 e 0,70 g.

O indivíduo que apresentou o maior índice de dominância (0,755) não era o maior em peso nem em comprimento. Curiosamente o menor índice de dominância pertenceu ao

indivíduo mais pesado. O índice de dominância médio foi de  $0,47 \pm 0,17$ . Foram efectuadas ANOVAs de factor único que demonstraram não existirem diferenças estatísticas de peso, comprimento ou índice de dominância entre os dois tratamentos, sham e operado ( $P > 0,05$ ).

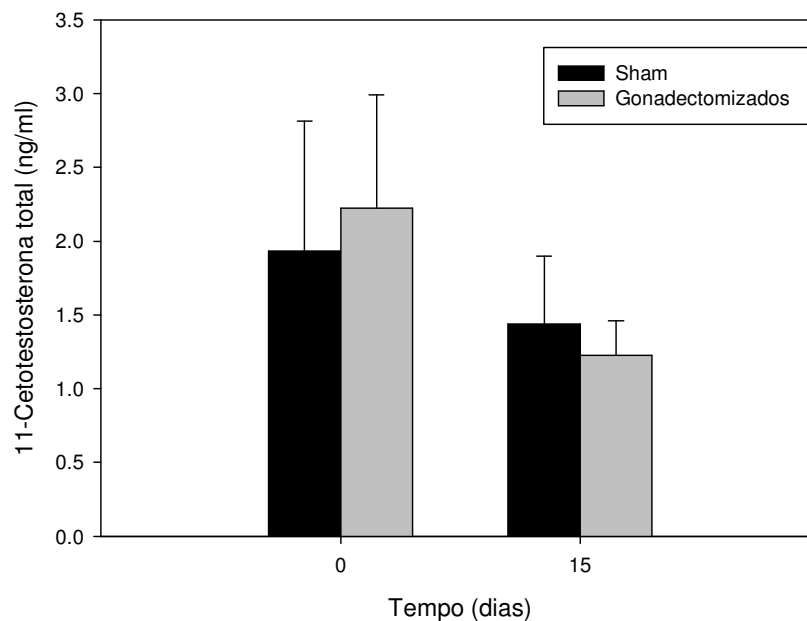
Foi efectuada uma ANOVA de factor único que evidenciou não haverem variações estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ), entre os índices de dominância da primeira ( $0,49 \pm 0,21$ ) e da segunda semana ( $0,61 \pm 0,08$ ). O que comprova que o comportamento dos animais não foi muito influenciado pelo procedimento cirúrgico.

## 2- Variação das hormonas no tempo e por tratamento



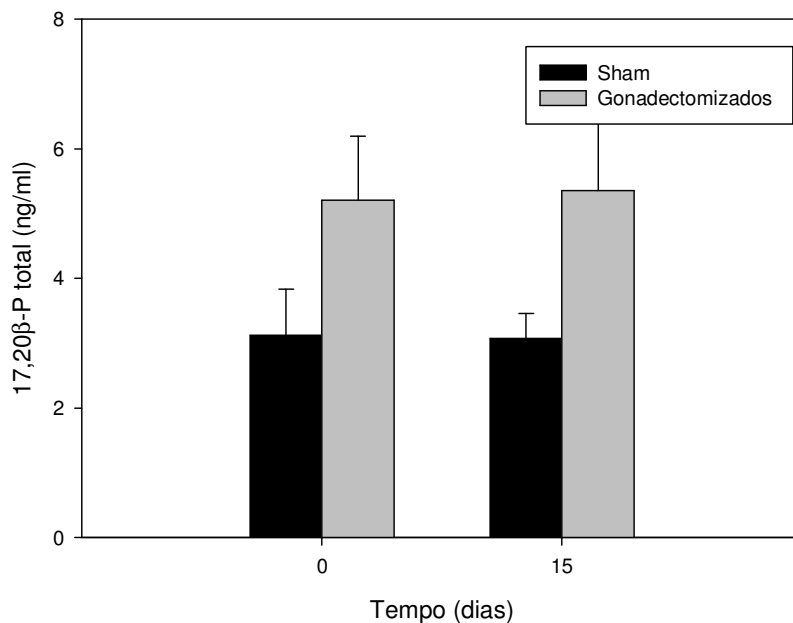
**Figura 2 - Níveis plasmáticos de testosterona total (média + erro padrão) nos peixes sham e gonadectomizados no início e no fim da experiência.**

Não se verificaram diferenças significativas de testosterona total (livre + sulfatos + glucoronídeos) entre sham e operados, nem entre o início e o fim da experiência. Os níveis de hormona variaram entre  $2,5 \pm 0,5$  ng/ml no grupo operado 15 e  $4,5 \pm 1$  ng/ml no grupo operado 0 (Figura 2).



**Figura 3 - Níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona (média + erro padrão) nos peixes sham e gonadectomizados no início e no fim da experiência.**

Não se verificaram diferenças significativas de 11-cetotestosterona total (livre + sulfatos + glucoronídeos) entre sham e operados, nem entre o início e o fim da experiência. Os níveis de hormona variaram entre  $1 \pm 0,25$  ng/ml no grupo operados 15 e  $2,5 \pm 1,25$  ng/ml no grupo operado 0 (Figura 3). O padrão foi semelhante ao da testosterona.



**Figura 4 - Níveis plasmáticos de 17,20β-P (média + erro padrão) nos peixes sham e gonadectomizados no início e no fim da experiência.**

Os níveis de 17,20 $\beta$ -P total (livre + sulfatos + glucoronídeos) foram significativamente diferentes entre sham e operados ( $p=0,042$ ), não tendo no entanto o teste de comparações múltiplas Holm-Sidak encontrado diferenças significativas entre os dois grupos para cada tempo tomado separadamente. Os níveis de hormona variaram entre  $2,5\pm 0,25$  nos sham e  $5\pm 0,5$  nos gonadectomizados (Figura 4).

### **3- Correlações de Pearson entre as variáveis analisadas**

Para o primeiro grupo de operações, o índice de dominância não apresentou correlação com nenhuma das variáveis (Tabela 5). Já a 11-KT livre (L) está correlacionada positivamente com a 11KT total e também com a T (L) e com a total. A 11-KT sulfato (S) por sua vez está correlacionada positivamente com T (S) e com 17,20 $\beta$ -P (S). A fracção glucorinada (G) da 11-KT está correlacionada com a fracção 17,20 $\beta$ -P (S) e com as fracções T (S), T (G) e T total; e a 11-KT (L) correlaciona-se com a 11-KT total. Quanto à T, a fracção livre correlaciona-se com as fracções sulfatadas e glucorinadas; a fracção sulfatada com a glucorinada e com a 17,20 $\beta$ -P (S); a T (G) está correlacionada com a T total e as fracções sulfatadas e glucorinada da 17,20 $\beta$ -P; enquanto a T total está correlacionada apenas com a 17,20 $\beta$ -P (L). Relativamente à 17,20 $\beta$ -P (L), esta está correlacionada com a fracção sulfatada e com o total da mesma hormona.

**Tabela 5 – Correlação múltipla de Pearson entre o índice de dominância (ID) e as hormonas testosterona e 11-cetotestosterona (livres, sulfatos, glucoronídeos e total) no 1º grupo de operações. Na 1ª linha o coeficiente de correlação e na 2ª linha o valor de p. O número de indivíduos n=20.**

	<b>11Kt (L)</b>	<b>11Kt (S)</b>	<b>11Kt (G)</b>	<b>11KT Total</b>	<b>T (L)</b>	<b>T (S)</b>	<b>T (G)</b>	<b>T Total</b>	<b>17,20b P (L)</b>	<b>17,20bP (S)</b>	<b>17,20b P (G)</b>	<b>1720bP Total</b>
<b>ID</b>	0.02 0.95	-0.12 0.61	0.24 0.31	0.04 0.88	-0.34 0.14	0.08 0.73	-0.39 0.09	-0.37 0.11	-0.22 0.34	0.07 0.76	-0.08 0.73	-0.22 0.36
<b>11Kt (L)</b>		-0.17 0.48	-0.19 0.42	0.99 0.00	0.49 0.03	-0.34 0.15	0.40 0.08	0.49 0.03	0.33 0.16	-0.35 0.13	0.19 0.43	0.25 0.30
<b>11Kt (S)</b>			0.40 0.08	-0.10 0.68	-0.12 0.60	0.74 0.00	-0.05 0.84	-0.04 0.85	-0.06 0.82	0.61 0.00	0.09 0.70	0.20 0.39
<b>11Kt (G)</b>				-0.08 0.74	-0.53 0.02	0.64 0.00	-0.48 0.03	-0.51 0.02	-0.41 0.07	0.64 0.00	0.14 0.57	-0.12 0.60
<b>11KT Total</b>					0.44 0.05	-0.25 0.28	0.36 0.12	0.44 0.05	0.29 0.21	-0.27 0.24	0.21 0.38	0.24 0.30
<b>T (L)</b>						-0.40 0.08	0.52 0.02	0.99 0.00	0.43 0.06	-0.41 0.07	0.04 0.87	0.28 0.23
<b>T (S)</b>							-0.57 0.01	-0.35 0.13	-0.40 0.08	0.90 0.00	0.08 0.74	-0.04 0.89
<b>T (G)</b>								0.57 0.01	0.56 0.01	-0.56 0.01	0.15 0.53	0.38 0.10
<b>T Total</b>									0.44 0.05	-0.37 0.11	0.06 0.78	0.32 0.173
<b>17,20bP (L)</b>										-0.46 0.04	0.23 0.33	0.88 0.00
<b>17,20bP (S)</b>											0.13 0.59	-0.05 0.84
<b>17,20bP (G)</b>												0.56 0.01

Relativamente aos indivíduos do segundo grupo de operações, o peso das gónadas e o índice de dominância não apresentam correlação com nenhuma variável (Tabela 6). Já a T (L) apresentou correlação positiva com a T (S), a T (G), a T total, a 11-KT (L), a 11-KT (G) e a 11-KT total; a T (S) com a T(L), T (G), a Ttotal, a 11-KT (L), a 11-KT (S), a 11-KT (G) e a 11KT total; a T (G) com a T(L), T(S), T Total, e a 11KT(G); a T total com a T(L), T(S), T(G), 11-KT (L), a 11-KT(G) e a 11-KT Total. A fracção livre da 11-KT correlaciona-se positivamente com a T(L),T(S), Ttotal, 11-KT (S) e 11KT total; a fracção 11-KT (S) correlaciona-se com o total da mesma hormona, 11 Kt (L) e T(S); a 11 kT(G) correlaciona-se com a T(L), T(S), T(G), e a Ttotal; enquanto que a 1KT total correlaciona-se com T (L),T (S),T Total, 11-kT (L),e a 11-kT (S).

**Tabela 6 – Correlação entre o índice de dominância (ID), peso das gónadas (Wgonads), e as hormonas testosterona e 11-cetotestosterona (livres, sulfatos, glucoronídeos e total) no 2º grupo de operações. Na 1ª linha o coeficiente de correlação, na 2ª linha o valor de p, e na terceira o número de indivíduos.**

	ID	T(L)	T (S)	T (G)	T Total	11-kT (L)	11-kT (S)	11 kT(G)	11KT Total
Wgonads (g)	0.02	0.04	-0.12	-0.37	-0.01	0.00	0.10	-0.28	-0.01
	0.94	0.84	0.60	0.0937	0.975	0.99	0.66	0.22	0.96
	20	22	22	22	22	22	22	22	22
ID		0.18	0.14	0.23	0.19	0.06	-0.22	0.40	0.07
		0.44	0.57	0.32	0.42	0.81	0.36	0.08	0.76
		20	20	20	20	20	20	20	20
T (L)			0.77	0.73	1.00	0.67	0.38	0.51	0.68
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.01	0.00
			22	22	22	22	22	22	22
T (S)				0.63	0.80	0.81	0.49	0.66	0.82
				0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
				22	22	22	22	22	22
T (G)					0.78	0.39	0.14	0.73	0.42
					0.00	0.07	0.55	0.00	0.05
					22	22	22	22	22
T Total						0.67	0.38	0.57	0.69
						0.00	0.08	0.01	0.00
						22	22	22	22
11-kT (L)							0.84	0.38	1.00
							0.00	0.08	0.00
							22	22	22
11-kT (S)								0.04	0.83
								0.87	0.00
								22	22
11 kT(G)									0.42
									0.05
									22

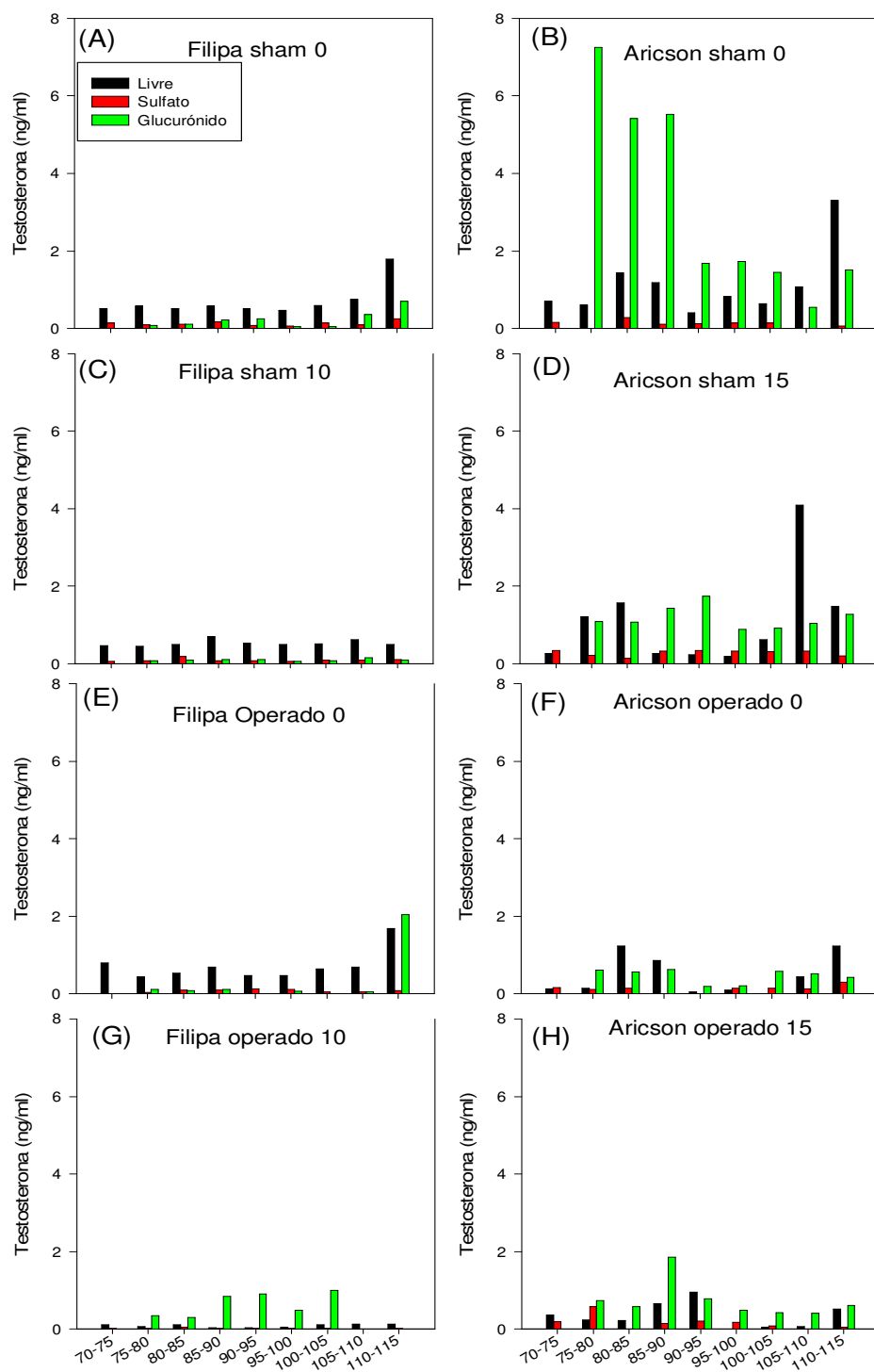
#### **4- Imunoreactividade do plasma sanguíneo**

Na TLC a testosterona corre na fracção 110-115 da Figura 5 pode verificar-se que apenas as amostras Filipa, as amostras Aricson ao tempo 0 e as amostra Aricson sham no final da experiência têm um pico conspícuo de imunoreactividade nessa fracção. Pode-se também verificar que nas amostras Filipa sham a 0 e 10 dias e operado a 0 dias a imunoreactividade está presente essencialmente na fracção livre, enquanto que a fracção glucorónido parece possuir alguma imuno-actividade não específica ao fim de 10 dias de gonadectomia. Nas amostras Aricson os níveis de imuno-actividade são mais elevados e para além dos picos de testosterona parece haver imuno-actividade mais polar. Nestas amostras a fracção glucorónido parece ser mais importante. Tal como nas amostras Filipa aos 15 dias de gonadectomia não é possível obter um pico distinto de testosterona, a imuno-actividade de glucorónido é importante mas corresponde a u esteróides mais polares.

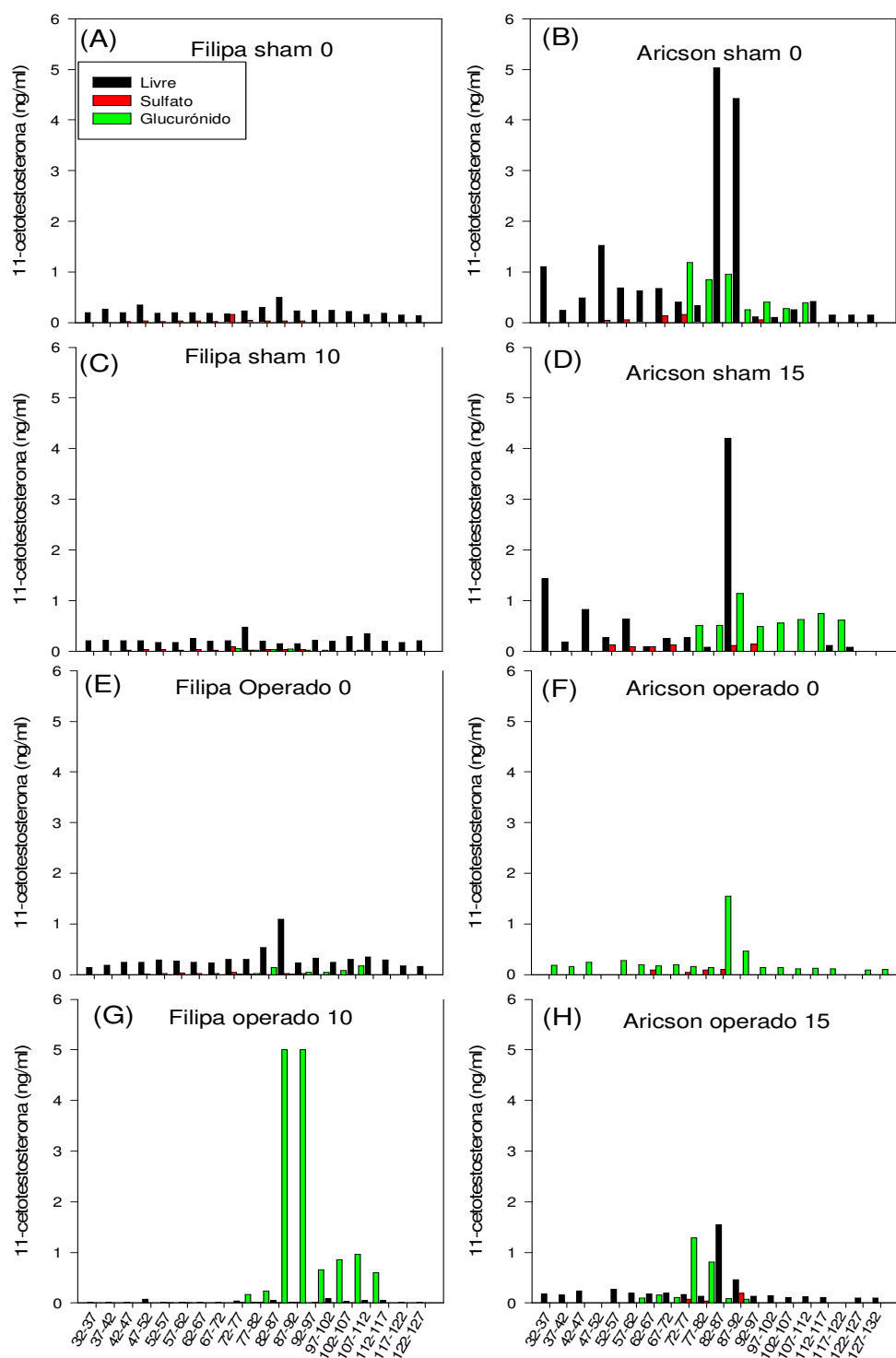
No caso das amostras Filipa e 15 no caso das amostras deste estudo) consoante parecem haver glucurónidos ausentes a se pode ver na figura 5 em relação a testosterona no tempo o zero, os indivíduos sham da Filipa (gráfico B) têm o pico da fracção de T (L) a condizer com pico da T da leitura obtida do bioscanner (figura 7); o mesmo já não acontece com nenhuma das fracções dos indivíduos sham do Aricson (gráfico A). Já nos indivíduos operados os picos tanto dos indivíduos do Aricson e como os da Filipa batem com os picos do bioscanner (gráficos C e D). No tempo 10, os picos da T (L) nos sham do Aricson batem certo, mas não nos dos sham da Filipa (gráficos E e F). Em relação aos operados tantos os do Aricson como os da Filipa batem certo no que concerne aos picos da T glucorinada (gráficos G e H).

Na TLC a 11-KT a imuno-actividade corre nas fracções 82-92 da Figura 6 pode verificar-se que apenas as amostras têm um pico de imuno-actividade nessa fracção No que concerne à 11-kT os picos do livre e da fracção glucorinada (figura 6) condizem com os picos da leitura no bioscanner (figura 7) tanto nos sham como nos operados do tempos zero e sham.





**Figura 5 – Imunoreactividade da testosterona nas fracções de TLC de plasma nos tratamentos sham e operado no início ( tempo 0) e no final da experiência (dias 10).**

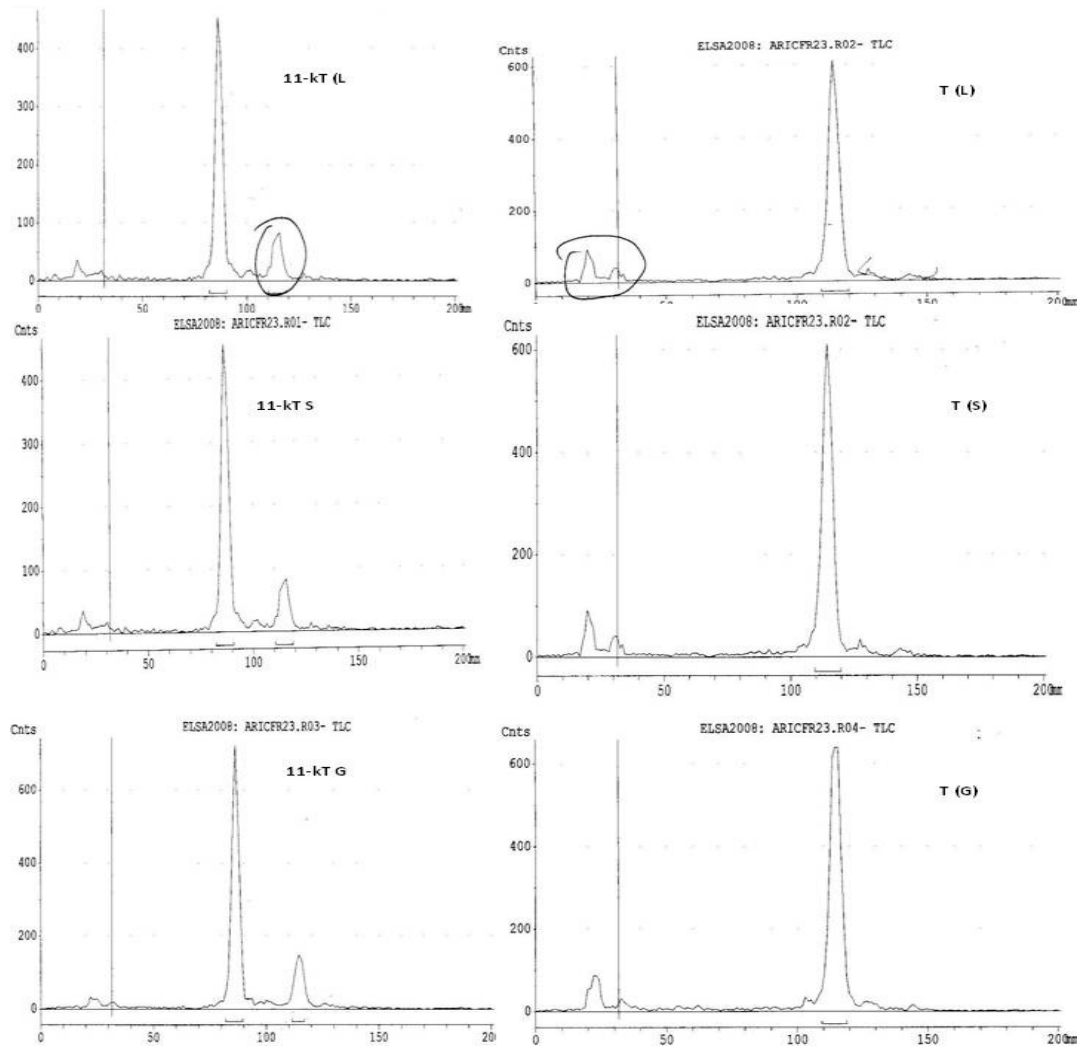


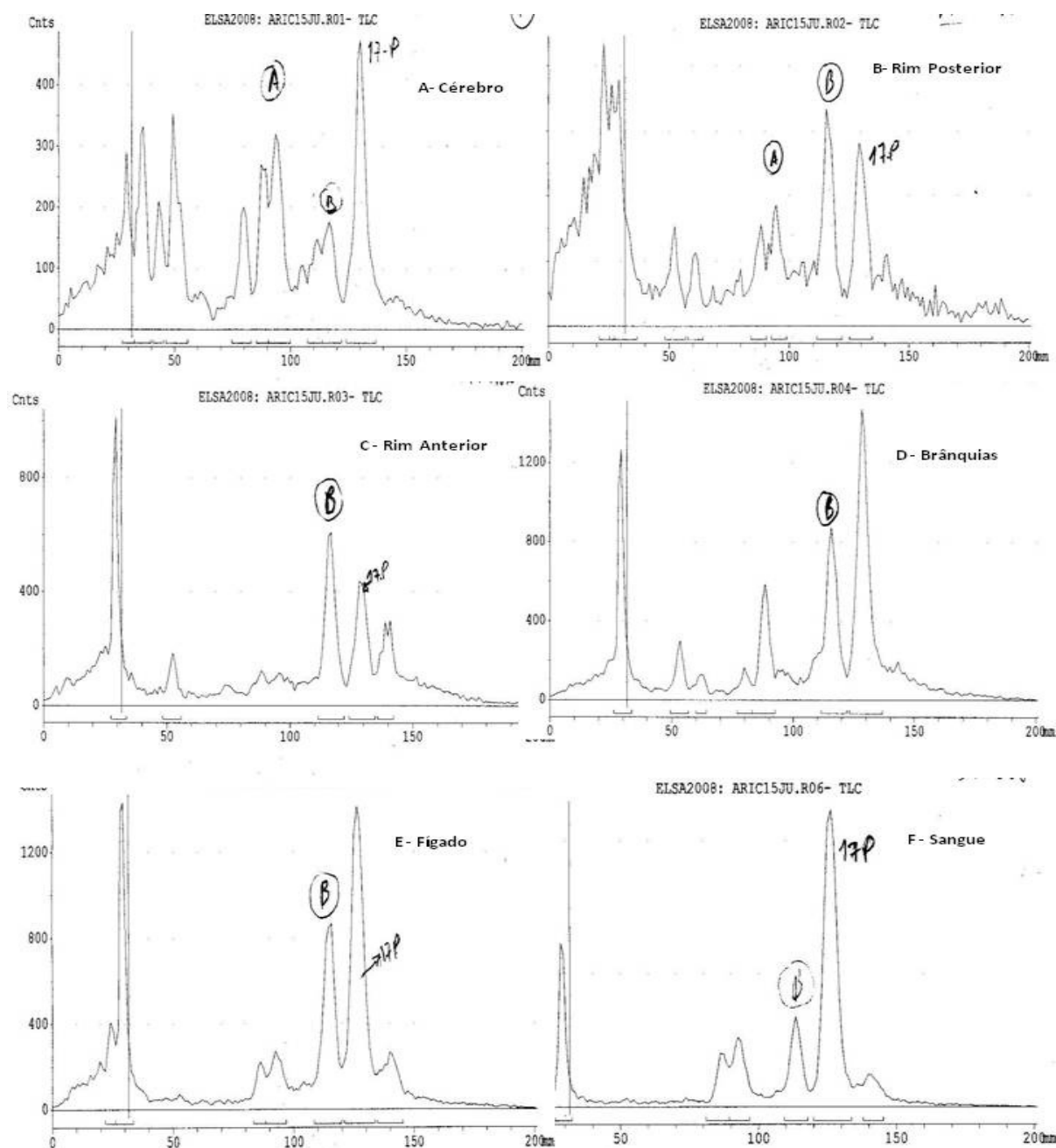
**Figura 6 – Gráficos das fracções dos radioimunoensaios de 11-cetotestosterona, para os tempos 0 e 10/15 e tratamentos sham e operado.**

### Figura 7 – Radiocromatogramas referentes às diferentes frações dos RIAs

Relativamente à testosterona entre os sham  $t_0$  e os sham  $t_{10/15}$ , houve um aumento considerável da testosterona livre; enquanto os níveis da mesma caíram entre os operados do  $t_0$  e os do  $t_{10/15}$ , tendo aumentado entre estes os níveis da fração glucoronada. Em relação à 11-cetotestosterona os níveis de 11-kT livre continuaram altos entre os sham  $t_0$  e os sham  $t_{10/15}$ . No caso dos operados, entre os do Aricson caiu ligeiramente o nível 11-kT livre, enquanto entre os da Filipa caíram quase que totalmente. No entanto é de se notar a subida da fração glucoronada em entre o  $t_0$  e o  $t_{10/15}$  dos indivíduos tanto da Filipa como do Aricson (figura 5).

### 5- Esteróidogénese nos tecidos periféricos





**Figura 8 – Radiocromatogramas dos metabolitos de  $[^3\text{H}]17\text{-P}$  em amostras de tecido incubados em solução de Ringer.**

Como se pode ver na figura 8 e na tabela 7, o tecido com maior grau de metabolização de do precursor  $17\text{-}\alpha\text{-H-P}$  é o rim posterior, seguido por ordem decrescente pelo rim anterior, o cérebro, as brânquias, o fígado e por fim o sangue.

**Tabela 7 – Os tecidos incubados e seu grau de metabolização da 17-  $\alpha$ -H-P**

<b>Tecidos</b>	<b>Grau de metabolização 17-<math>\alpha</math>- hidroxiprogesterona</b>	<b>Contagem CPM 17-<math>\alpha</math>-H-P</b>
Sangue	Baixo	1232
Cérebro (Bulbo olfativo e região préoptica)	Alto	67,1
Fígado	Médio	227,8
Brânquias	Médio	221,6
Rim anterior	Alto	65,3
Rim posterior	Muito alto	16,3

De se notar também na figura 8 os picos assinalados pelas letras A e B, sendo que o pico A suspeitava-se ser 11-kT e o B suspeitava-se ser T. Após a acetilação das fracções correspondentes aos picos B e oxidação com trióxido de crómio as correspondentes aos picos A, ficou provado tratarem-se das hormonas referidas.

#### 4- Discussão

A quase total falta de efeito que a gonadectomia teve no comportamento sexual da *Oreochromis mossambicus* está em concordância com os trabalhos de Noble & Kumpf (1936; 1937). Tais autores castraram machos de *Beta splendens* e de *Hemichromis bimaculatus*, sem ter provocado alteração alguma no comportamento sexual dos mesmos. Tendo eles demonstrado que tal resultado poderia estar relacionado com a regeneração das gónadas por eles verificado. Essa pequena magnitude do efeito esperado pelas gonadectomias nos níveis de esteróides e no comportamento pode-se dever ao facto dos animais operados terem sofrido um processo de hipertrofia compensatória. Ou seja após a remoção mecânica da quase totalidade das gónadas, alguma fracção remanescente desse órgão tornou-se a crescer de forma a equilibrar os baixos níveis hormonais. Kobayashi et al., (1991) exortaram que no peixe vermelho as gónadas reabilitam através de um processo que pode envolver desdiferenciação do tecido que restou após a cirurgia. Beyer et al. (1970) reportaram que é virtualmente impossível excluir todas as fontes de esteróides sexuais de um organismo. Outra explicação seria que as fracções remanescentes fossem capazes de produzir hormonas numa taxa suficiente para manter o comportamento agressivo em níveis normais. Forselius (1957), apresentou evidências que basta apenas um fragmento equivalente a 2% da massa intacta para manter os caracteres sexuais secundários. A gonadectomia noutras espécies não produziu resultados consistentes com os deste estudo. Por exemplo, indivíduos da espécie *Gasterosteus aculeatus* sob longos fotoperíodos, indivíduos de *Tichogaster tricopterus* e duas espécies de *Lepomis sp.* Falharam em exibir o comportamento sexual de um peixe normal (Baggerman, 1957; Johns & Liley; 1970; Smith, 1969). No peixe gobiídeo *Bathygobius soporator*, os machos castrados demonstraram um comportamento sexual aberrante e a eliminação de comportamentos agonísticos (Tavolga, 1955). Alguns desses estudos no entanto falharam em verificar se ocorreu regeneração gonadal.

Pode-se também justificar a fraca oscilação dos androgénios após a gonadectomia pela produção extragonadal dessas hormonas. Segundo DeGroot (1989), os esteróides sexuais no sangue não derivam só da secreção glandular directa. Um numero considerável de androgénios e estrogéneos são também sintetizados por tecidos extragonadais a partir de precursores secretados.

Rocha & Reis-Henriques (1996) assumem que os níveis de testosterona para que variam entre 6-13 ng/ml, o que mostra que os valores obtidos neste estudo (2,5 e 4,5 ng/ml) estão aquém do esperado. No entanto estão dentro do intervalo de valores admitidos para a *Oreochromis mossambicus* em ambiente natural, que varia de 1 a 12 ng/ml (Cornish, 1998). Relativamente à 11-cetotestosterona os valores obtidos variam entre 1 a 2,5 ng/ml, encontrando-se dentro da classe dos valores conhecidos para esta espécie, que se encontram entre 0,5 e 6,7 ng.ml<sup>-1</sup> (Ros et al., 2004).

A quantidade bastante considerável de 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona convertido pelas brânquias da *Oreochromis mossambicus*, está de acordo com a alta eficiência de conversão desse substrato encontrado por Kime & Ebrahimi (1997). Embora o

metabólito encontrado neste estudo - a testosterona – difira dos metabólitos encontrados no trabalho desses autores; onde as brânquias de espécies como *Oncorhynchus mykiss*, *Carassius auratus* e, *Cyprinus carpio* converteram o [3H] -17-P em metabólitos variados como: 17,20aP; 17,20BP; KT e 17,20aP. Tais autores crêem que os metabólitos produzidos pelas brânquias de forma tão eficiente estão ligados a comunicação química, ou seja, possuem funções feromonais. Diferentemente da alta eficiência de conversão de [3H]-17-P pelo sangue de *Carassius auratus*, encontrado por Ebrahimi et al. (1996), os nossos valores de metabolização por esse tecido foram relativamente baixos. Tal como o tecido adrenal dos mamíferos, o tecido interrenal nos teleósteos pode produzir androgénios assim como corticosteróides e progestinas (Vermeulen *et al.*, 1995). A produção in vitro de androstenediona pelo tecido interrenal foi observada em alguns peixes como é o caso da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Balm *et al.*, 1989), do (coho salmon), *Oncorhynchus kisutch* (Schreck *et al.*, 1989), e do peixe-gato Africano, *Clarias gariepinus* (Vermeulen *et al.*, 1995). Apesar de Chester-Jones et al. (1987) afirmarem que um dos principais produtos do metabolismo da interrenal nos teleósteos é o cortisol e que o principal caminho metabólico é via 17H-P, tal substância não foi encontrado como metabólito de nenhum dos tecidos estudados.

Os altos valores de metabolização do precursor encontrados no rim posterior corroboram a ideia de Cornish (1998) que afirma que uma das maiores fontes de produção de esteróides extra-testicular é o tecido adrenal.

DeGroot (1989c) assegura que o fígado é o principal local para o metabolismo e remoção de esteróides, embora os valores médios de metabolização do precursor vem contradizer tal constatação. Em homogenatos de rim de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, a [3H]-17 $\alpha$ -hydroxyprogesterona é metabolizada em androstenediona, que por sua vez é metabolizada em 11 $\beta$ -hydroxyandrostenediona e testosterona (Arai et al., 1969).

## **5- Conclusões e Recomendações**

As hormonas são muito importantes não só para os peixes mas para todos os vertebrados, pois activam e modificam o comportamento, e o comportamento por sua vez pode alterar os níveis de hormonas, em particular os androgénios. No caso dos teleósteos muitos estudos têm sido feitos para ver quais os efeitos da castração sobre o comportamento e os níveis hormonais.

Conclui-se que o índice de dominância - que foi usado como indicador dos comportamentos sexuais e agonísticos dos espécimes - demonstrou não estar relacionado com nenhum dos factores como peso, comprimento, ou níveis hormonais. Este estudo permitiu observar que o procedimento cirúrgico não afectou o comportamento dos espécimes, uma vez que o índice de dominância não apresentou diferenças estatisticamente significativas nem entre tratamentos nem entre o t0 e t15.

Conclui-se também que as gonadectomias afectaram embora de uma forma ténue os níveis hormonais, que tiveram uma pequena diminuição (excepto no caso da 17,20 BP). A fraca magnitude do efeito esperado da cirurgia deve-se a fenómenos de regeneração tecidular das gónadas, feedback positivo e/ou a produção extragonadal de esteróides. Tendo sido concluído que o tecido que tem maior capacidade de produção extragonadal de esteróides é o rim, pois metabolizou a maior quantidade de 17H-P. Verificou-se ainda que os efeitos derivados da castração são muito polémicos entre os diversos autores que se debruçam sobre o tema.

Este estudo vem assim contribuir com mais dados para a descoberta de outros caminhos metabólicos nos teleósteos (principalmente na tilapia moçambicana) capazes de segregar androgénios que não as gónadas.

Recomenda-se para estudos futuros que aumente-se a dosagem do MS222 para 0,3 g/l, pois os indivíduos de tilapia demonstraram-se bastante resistentes a concentração inicial usada de 0,15 g/l. Aconselha-se também em estudos futuros usar-se espécimes de maior tamanho pois isto facilita o procedimento cirúrgico. Para além de análise macroscópica das gónadas aconselha-se também uma amostragem microscópica para localizar conjuntos de células que podem sofrer hiperplasia. Recomenda-se fazer incubações de outros tecidos no peixe para detectar outros potenciais fontes extragonadais de androgénios; e também identificar outros resíduos do metabolismo da 17H-P. Aconselha-se também a seguir a evolução do animal durante mais tempo, de forma a acompanhar mais detalhadamente a evolução dos níveis hormonais e do comportamento dos espécimes.

Referir que estudos desse género são muito importantes tendo em conta a nacionalidade do autor da presente Tese, a génese recente da Universidade Publica Nacional de Cabo Verde (UNICV), e as necessidades de pesquisa e desenvolvimento científico conexas ao desenvolvimento de uma Instituição desse calibre, no que tange a qualidade de Investigação científica – nesse ponto específico realçar as possibilidades de replicação de Investigação na área de Endocrinologia Molecular Comparada, aplicada às Ciências Marinhas.



## 6- Referências Bibliográficas

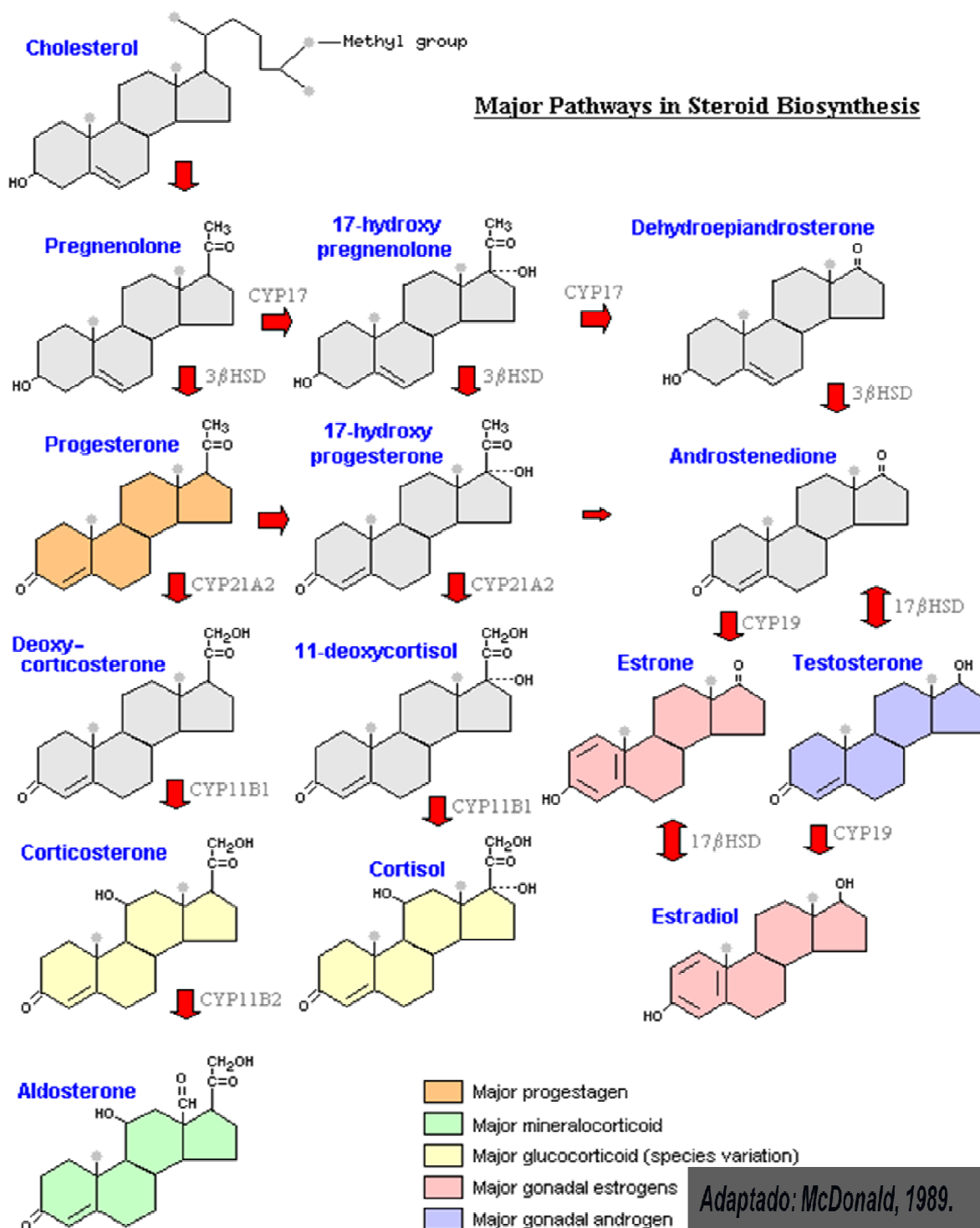
- Amano M, Ikuta K, Kitamura S, Aida K. (1999). Effects of photoperiod on salmon GnRH mRNA levels in brain of castrated underyearling precocious male masu salmon. *Gen Comp Endocrinol.* 115:70–75.
- Arai, R., Tajima, H., Tamaoki, B. (1969). In vitro transformation of steroids by the head kidney, the body kidney, and the corpuscles of Stannius of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General Comparative Endocrinology*, 12:99-109.
- Aronson, L. R., Scharf, A., and Silverman, H. (1960). Reproductive two androgens has also been proposed by Cardwell behavior after gonadectomy in males of the cichlid fish, *Aequidens latifrons*. *Anat. Rec.* 137, 335.
- Baggerman, B. (1957). An experimental study on the timing of breeding and migration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Arch. neerl. Zool.* 12: 105-317.
- Balm, P.H.M., Lambert, J.G.D., Wendelaar Bonga, S.E. (1989) Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 76:53-62.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A., Canario, A.V.M. (2007). Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biology.* 5 (54), 1-11.
- Bentley, P.J. (1982). *Comparative Vertebrate Endocrinology*. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge, London. 485 p.
- Beyer, C, Rivaud, N. & Cruz. M. L. (1970). Initiation of sexual behavior in prepuberally ovariectomized rabbits. *Endocrinology* 86: 171-174.
- Bhasin, S., Woodhouse, L., Storer, T.W. (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* 170, 27-38.
- Borg, B., Antonopoulou, E., Mayer, I., Andersson, E., Berglund, I., Swanson, P. (1998). Effects of Gonadectomy and Androgen Treatments on Pituitary and Plasma Levels of Gonadotropins in Mature Male Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Parr-Positive Feedback Control of Both Gonadotropins. *Biology of Reproduction.* 58, 814-820
- Borges, R.A., Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canário, A.V.M. (1998). Short-term social modulation of 11-ketotestosterone urinary levels in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* during male–female interaction. *Acta Ethol.* 1: 43–48.
- Chester-Jones, I., Ingleton, P.M., Phillips, J.G. (Eds.) (1987). *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*. Plenum Press, New York. 666 p.
- Cornish, D. A. (1998). Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonads of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Department of Physiology, University of the North, South Africa
- Dadzie, S. & Hyder, M. (1976). Compensatory Hypertrophy of the Remaining Ovary and the Effects of Methallibure in the Unilaterally Ovariectomized Tilapia *áurea*. *General and Comparative Endocrinology.* 29, 433-440.

- DeGroot, L. J. (1989a). Endocrinology. 2nd Edition, Vol I. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Whashington, USA. 802 p.
- DeGroot, L. J. (1989b). Endocrinology. 2nd Edition, Vol II. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Whashington, USA. 802 p.
- DeGroot, L. J. (1989c). Endocrinology. 2nd Edition, Vol III. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Whashington, USA. 802 p.
- De Oliveira, R.F., Almada, V.C. (1990). Analise qualitativa do comportamento na tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlida) – Etograma dos juvenis. Actas do I Congresso Nacional de Etologia. P. 153-162.
- Ebrahimi, M., Scott, A.P. and Kime, D.E. (1996). Extragonadal production of 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 104: 296–303.
- Fernald, R. D. (1976). The effect of testosterone on the behavior and coloration of adult male cichlid fish (*Haplochromis burtoni*, Gunther). Horm. Res. 7: 172–178.
- Forselius, S. (1957). Studies on anabantid fishes. Parts I, II and III. Zool. Bid. Upps. 32: 97-597.
- Francis, R. C., Jacobson, B., Wingfield, J. C., and Fernald, R. D. (1992a). Castration lowers aggression but not social dominance in male *Haplochromis burtoni* (Cichlidae). Ethology 90: 247–255.
- Francis, R. C., Jacobson, B., Wingfield, J. C., and Fernald, R. D. (1992b). Hypertrophy of gonadotropin releasing hormone-containing neurons after castration in the teleost *Haplochromis burtoni*. J Neurobiol 23:1084–1093.
- García-Segura, L.M. (2008). Acciones no reproductoras de las hormonas sexuales en el cerebro. Avances en Endocrinología Comparada. 4, 13-18.
- Hiatt, E.S., Valadka, R.J., Schwartz, N.B. (1987). Sex Differences Following Gonadectomy in Basal Gonadotropin Secretion Rate of Rat Pituitary Fragments in Vitro. Biology of Reproduction. 37: 1114-1120.
- Johns, L. S., Liley, N.R. (1970). The effects of gonadectomy and testosterone treatment on the reproductive behavior of the male blue gourami, *Trichogaster trichopterus*. Can. J. Zool. 48: 977- 987.
- Kime, D.E., Ebrahimi, M. (1997). Synthesis of 17,20 $\alpha$ - and 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-ones, 11-ketotestosterone and their conjugates by gills of teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry. 17: 117– 121.
- Kime, D. E. (1993). “Classical” and “non-classical” reproductive steroids in fish. Rev. Fish Biol. Fisheries 3: 160 –180.
- Kobayashi, M., Aida, K., Stacey, N.E. (1991). Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. Zoological Science, 8:389–393.
- Lehri, G. K. (1966). Endocrine Activity of Gonadectomized Fish, *Clarias batrachus* (Linn.). Naturwissenschaften. School of Studies in Zoology, Vikram University, Ujjain. p.390.
- Levavi-Sivan, B., Biran, J. Fireman, E. (2006). Sex Steroids Are Involved in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone and Dopamine D<sub>2</sub> Receptors in Female Tilapia Pituitary. Biology of Reproduction. 75, 642–650.
- Liley, N.R., Olsen, K.H., Foote, C.J., Van der Kraak, G.J. (1993). Endocrine changes associated with spawning behavior in male kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*) and the effects of anosmia. Horm Behav 27: 470-487.
- McDonald, L.E. (1989). Veterinary Endocrinology and Reproduction. 4th Edition. Lea & Febiger. Washington, USA. 571p.

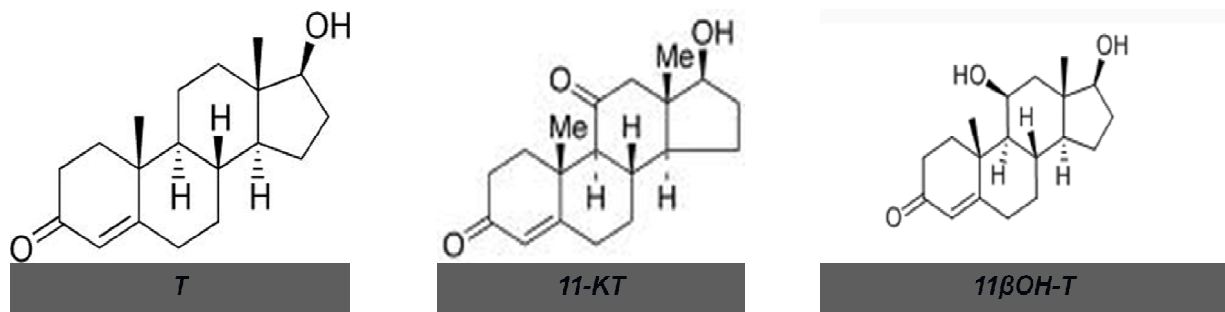
- Mayer, I., Rand-Weaver, M., Borg, B. (1998). Effects of Gonadectomy and Steroids on Plasma and Pituitary Levels of Somatolactin in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *General and Comparative Endocrinology*. 109, 223–231.
- Mayer, I., Lundqvist, H., Berglund, I., Schmitz, M., Schulz, R., and Borg, B. (1990). Plasma levels of five androgens and 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone in immature and mature male Baltic salmon (*Salmo salar*) parr, and the effects of castration / androgen replacement in mature parr. *Can. J. Zool.* 68, 263–267.
- Neat, F.C., Mayer, I. (1999). Plasma concentration of sex steroids and fighting in male *Tilapia zillii*. *Journal of Fish Biology*. 54: 695-697.
- Noble, G. K., Kumpf, K.F. (1936). The sexual behavior and secondary sex characteristics of gonadectomized fish. *Anat. Rec. (Suppl.)*. 67: 113.
- Noble, G. K., Kumpf, K.F. (1937). Sex reversal in the fighting fish *Betta splendens*. *Anat. Rec. (Suppl.)* 70: 97..
- Norris, D. O. & Jones, R. E. (1987). *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Plenum Press. New York. 613 p.
- Oliveira, R.F., Canario, A.V.M. (2009). Hormones and social behavior of cichlid fishes: a case study in the Mozambique tilapia. *Journal of Aquaculture and Aquatic Science. Cichlid Research: State of the art*. 9, 187-207.
- Oliveira, R.F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L.A., Canario, A.V.M. (2002). Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 132: 203–215.
- Parhar IS, Soga T, Sakuma Y. (1998). Quantitative in situ hybridization of three gonadotropin-releasing hormone-encoding mRNAs in castrated and progesterone-treated male tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 112:406– 414.
- Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D. (2006). Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. *Behavioural Brain Research*. 166, 291–295.
- Rocha, M.J. & Reis-Henriques, M.A. (1996). Plasma and Urine levels of C18, C19 and C21 steroids in an asynchronous fish, the Tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 115C (3), 257-264.
- Schreck; C.B.; Bradford C.S.; Fitzpatrick M.S.; Patifio R.; (1989). Regulation of the interrenal of fishes: non-classical control mechanisms. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7:259-265.
- Smith, R. J. F. (1969). Control of prespawning behavior of sunfish (*Lepomis gibbosus* and *L. megalotis*). 1. Gonadal androgens. *Anim. Behav.* 17: 277-285.
- Soga, T., Sakuma, Y., Parhar, I.S. (1998). Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, preoptic and midbrain of male tilapia. *Brain Res Mol Brain Res* 60:13–20.
- Soma, K.K., Francis, R.C., Wingfield, J.C., Fernald, R.D. (1996). Androgen regulation of hypothalamic neurons containing gonadotropin-releasing hormone in a cichlid fish: integration with social cues. *Horm Behav.* 30: 216–226.
- Stacey, N.E. & Cardwell, J.R. (1994). Hormones as sex pheromones in fish: widespread distribution among freshwater species. *Behaviour*. Department of Biological Sciences, University of Alberta. Canadá. 15 p.
- Vermeirssen, E.L.M., Scott, A.P. (1996). Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20  $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 180-194.

- Vermeirssen, E.L.M., Scott, A.P., Liley, N.R. (1997). Female rainbow trout urine contains a pheromone which causes a rapid rise in plasma 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one levels and milt amounts in males. *J Fish Biol* 50: 107-119.
- Vermeulen, G.J., Lambert, J.G.D., Teitsma, C.A., Zandbergen, M.A., Goos, H.J.T., (1995). Adrenal tissue in the male African catfish, *Clarias gariepinus*: localization and steroid hormone secretion. *Cell and Tissue Research*, 280:653-657.
- Vieira, F. P. (2009). Efeito da gonadectomia na potência olfactiva da urina de machos de *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). Tese de Mestrado em Biologia Marinha. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve. Faro, Portugal. 44 p.
- Tavalga, W. N. (1955). The effects of gonadectomy and hypophysectomy on the prespawning behavior in males of the gobiid fish *Bathygobius soporator*. *Physiol. Zool.* 28: 218-233.
- Wapler-Leong, D. C. Y., Reinboth, R. (1974). The influence of androgenic hormone on the behavior of *Haplochromis burtoni* (Cichlidae). *Fortschr. Zool.* 22, 334–339.

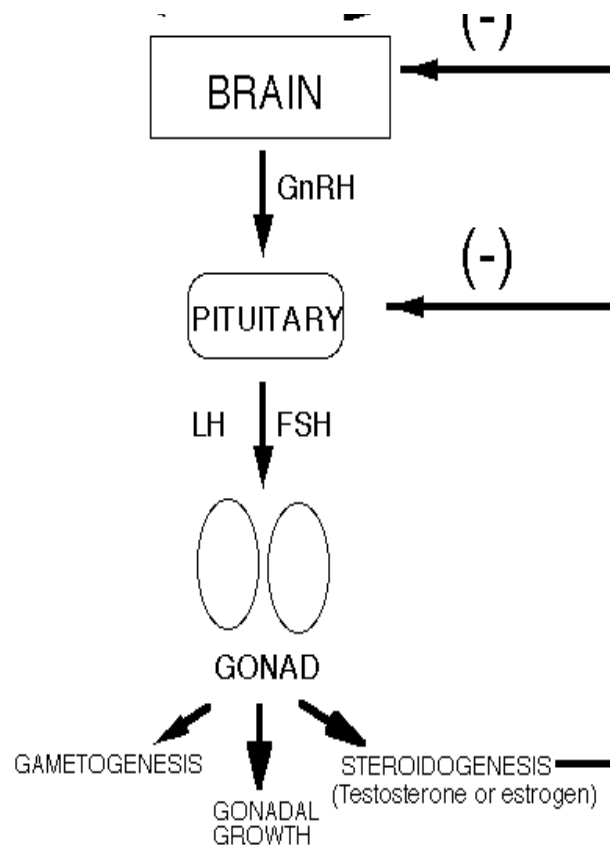
## Anexo 1: Principais caminhos metabólicos na Biossíntese de Esteroides.



**Anexo 2: Diagrama com a estrutura molecular dos androgénios: Testosterona (T), 11-Cetotestosterona (11-KT), e 11-beta-hidroxi-testosterona (11 $\beta$ -OHT).**



**Anexo 3: Representação esquemática do eixo hipotalâmico – pituitário – gonadal (HPG), assinalando a retroação regulatória.**

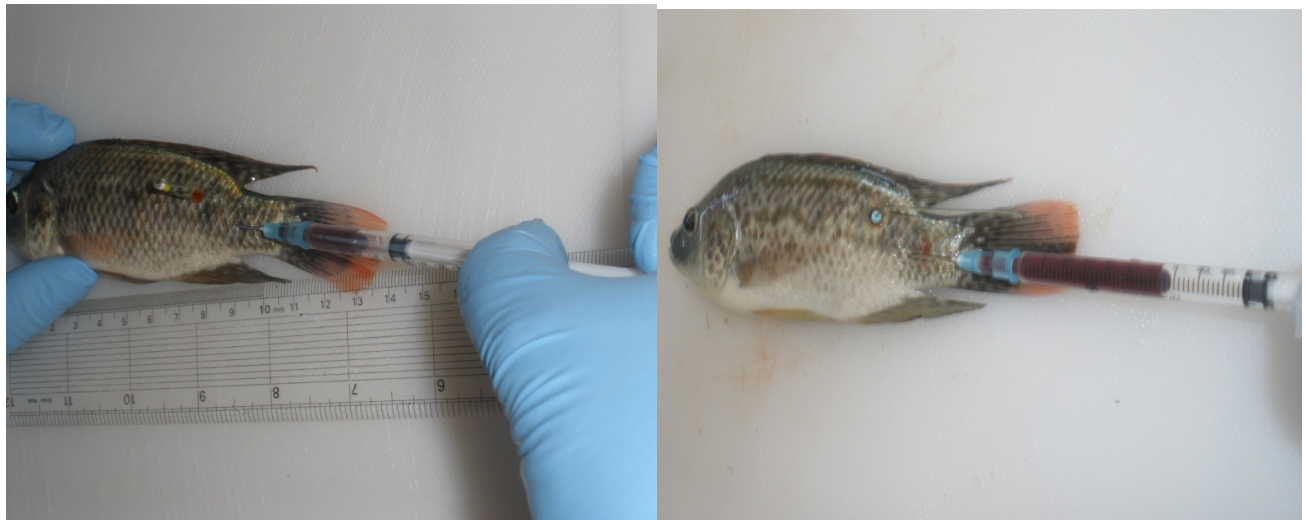


**Anexo 4 – Pormenor do acondicionamento dos espécimes de *Oreochromis mossambicus* nos tanques do laboratório húmido, sob condições controladas.**





**Anexo 5 – Pormenor de recolha de amostras sanguíneas dos espécimes no pré e no pós-operatório.**

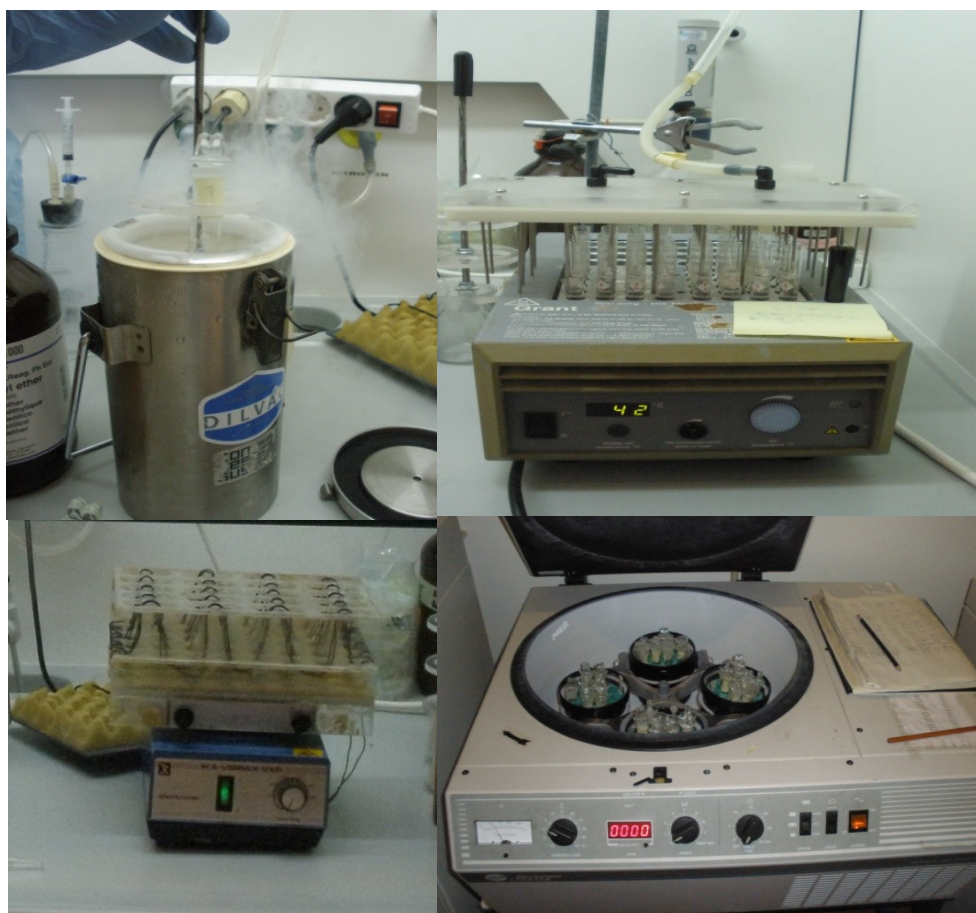


**Anexo 6 – Pormenor do procedimento cirúrgico num dos espécimes pertencentes ao experimento.**





## Anexo 7 – Pormenor do procedimento de extração de esteroides livres



**Anexo 8 – Pormenor do procedimento de cromatografia de camada fina  
(TLC – thin layer chromatography)**

